UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II

Unité d'Enseignement et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques

Année 1974, thèse nº 675

DOSAGE DES 11 OXY 17 HYDROXY CORTICOSTEROIDES URINAIRES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Thèse pour le Doctorat en Pharmacie
(diplôme d'Université)
présentée et soutenue publiquement
le mercredi 26 juin 1974

par **François MIGOT**
Pharmacien
Assistant de Physique Pharmaceutique
né le 23 Mai 1944 à Périgueux (Dordogne)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. Cl. VRIGNAUD, *Professeur*..... *Président*

M. P. BLANQUET, *Professeur*.....
Mme G. ROUGIER, *Professeur*..... *Juges*
M. R. CROCKETT, *Professeur*.....
Mme S. LARCEBAU, *Professeur*.....

Amicale Corporative des Étudiants en Médecine de Bordeaux
75, cours de la Somme - 33000 BORDEAUX - Tél. 92.77 06

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547319_0032

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II

Unité d'Enseignement et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques

Année 1974, thèse nº 675

DOSAGE DES 11 OXY 17 HYDROXY CORTICOSTEROIDES URINAIRES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Thèse pour le Doctorat en Pharmacie
(diplôme d'Université)
présentée et soutenue publiquement
le mercredi 26 juin 1974

par **François MIGOT**
Pharmacien
Assistant de Physique Pharmaceutique
né le 23 Mai 1944 à Périgueux (Dordogne)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. Cl. VRIGNAUD, *Professeur*..... *Président*

M. P. BLANQUET, *Professeur*.....
Mme G. ROUGIER, *Professeur*..... *Juges*
M. R. CROCKETT, *Professeur*.....
Mme S. LARCEBAU, *Professeur*.....

Amicale Corporative des Étudiants en Médecine de Bordeaux
75, cours de la Somme - 33000 BORDEAUX - Tél. 92.77 06

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MON PERE ET A MA MERE,

Nous leur dédions ce travail en gage de notre profonde affection et notre immense reconnaissance.

A MA FEMME,

Avec toute l'affection que je lui porte.

A MA FILLE CECILE,

Avec toute ma tendresse.

A MES FRERES,

A MES BEAUX-PARENTS,

A MES BELLES-SOEURS ET BEAUX-FRERES,

A TOUS MES AMIS.

A LA MEMOIRE DE MONSIEUR LE PROFESSEUR R. CASTAGNOU,

A TOUS NOS MAITRES DE LA FACULTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE,

En reconnaissance pour la qualité de l'enseignement qu'ils nous ont dispensé durant toutes nos études universitaires.

Il nous est particulièrement agréable de pouvoir exprimer nos remerciements à toutes les personnes qui ont soit jugé, soit apporté leur collaboration à la réalisation de ce travail :

Monsieur le Professeur DEVAUX en acceptant de faire partie du comité de lecture.

Monsieur MATHIEU, Chef de travaux, qui, à l'origine de ce travail, nous a maintes fois guidé et fait bénéficier de sa parfaite connaissance de l'hormonologie ; qu'il veuille trouver ici l'assurance de notre gratitude.

Monsieur le Professeur RIVIERE qui nous a facilité l'étude de clinique de ce travail.

Madame PARIS et Mademoiselle OLIVIER pour leur précieuse collaboration.

Les Chefs de Travaux et Assistants du laboratoire de Physique pharmaceutique.

Madame DESPONS qui, par son dévouement et son amabilité nous a si efficacement aidé.

———————

A NOS JUGES

Madame le Professeur S. LARCEBAU,

Professeur sans chaire (Toxicologie),
Docteur en Médecine,
Licenciée ès-Sciences,
Chevalier des Palmes Académiques.

En toute occasion vous nous avez toujours manifesté la plus cordiale sympathie. Vous nous en donnez une nouvelle preuve en acceptant de juger notre travail.

Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

Monsieur le Professeur R. CROCKETT,

Professeur titulaire à titre personnel (Biochimie pharmaceutique)
Licencié ès-Sciences,
Interne en pharmacie des Hôpitaux de Bordeaux,
Médaille d'or de l'Internat.
Biochimiste - Assistant des Hôpitaux de Bordeaux,
Chevalier des Palmes Académiques.

Le sujet de ce travail nous a tout naturellement conduit vers vous.

Vous nous faites l'honneur de siéger dans notre jury de thèse.
Nous vous exprimons notre très sincère reconnaissance.

A NOS JUGES (Suite).

———

Madame le Professeur G. ROUGIER,

Professeur de Biologie appliquée à l'Education Physique
et aux Sports.
Directeur de l'Institut d'Education Physique,
Chevalier de la Légion d'Honneur,
Officier des Palmes Académiques,
Commandeur du Mérite Sportif,
Médaille d'Argent du Service de Santé de la Marine.

Veuillez trouver ici l'expression de notre reconnaissance pour le grand honneur que vous nous faites en acceptant de siéger dans le jury de notre thèse.

Monsieur le Professeur P. BLANQUET,

Professeur de Physique Nucléaire appliquée et Radiobiologie,
Biologiste des Hôpitaux, Chef de Service,
Docteur es-Sciences Physiques,
Chevalier des Palmes Académiques,
Médaille de Vermeil du Service de Santé de la Marine,
Visiting Professor de l'Université de Californie
(Berkeley U.S.A.).

Dès le début de nos études, vous avez bien voulu nous accepter dans votre laboratoire, nous vous exprimons toute notre gratitude pour la compréhension et la confiance que vous nous avez témoignées en plusieurs occasions.
Veuillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE.

———

Monsieur le Professeur Cl. VRIGNAUD,

Professeur sans Chaire (Physique pharmaceutique)
Licencié es - Sciences,
Attaché des Hôpitaux.

Vous nous avez fait l'honneur de nous compter parmi vos assistants. En acceptant de nous diriger et de nous conseiller dans l'exploitation de ce travail, vous nous avez fait bénéficier de vos immenses connaissances dans un climat d'une rare cordialité.

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider cette thèse.

Croyez, Monsieur le Professeur à notre immense reconnaissance et à notre profond respect.

DOSAGE DES

11 OXY - 17 HYDROXYCORTICOSTEROIDES URINAIRES

PAR

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Observations d'épreuves dynamiques et étude des répercussions de l'effort physique sur l'excrétion urinaire des corticostéroïdes.

===

SOMMAIRE

———

INTRODUCTION

TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE ET EXPERIMENTAL

CHAPITRE I. Rappel biochimique du métabolisme des corticostéroïdes 5

CHAPITRE II. Différentes techniques de dosage des corticostéroïdes urinaires. 8

CHAPITRE III. Particularités du dosage des corticostéroïdes par chromatographie en phase gazeuse. 13

CHAPITRE IV. Dosage des 17 hydroxycorticostéroïdes urinaires par chromatographie en phase gazeuse. 21

— Matériel et technique 21
— Résultats 26

CHAPITRE V. Comparaison entre le dosage colorimétrique et le dosage par chromatographie en phase gazeuse 31

CHAPITRE VI. Discussion de la méthode 35

CHAPITRE VII. Observation d'épreuves cliniques dynamiques 38

CHAPITRE VIII. Etude des variations de l'excrétion des 17 hydroxycorticostéroïdes urinaires au cours d'un effort physique prolongé 44

CONCLUSIONS 48

BIBLIOGRAPHIE.

INTRODUCTION

———

L'application de techniques nouvelles auparavant utilisées dans l'industrie a fait effectuer à la chimie biologique de nombreux progrès.

L'exploration fonctionnelle de la glande surrénale a conduit à étudier la sécrétion des hormones cortico-surrénaliennes par l'intermédiaire de leurs métabolites urinaires. Il est alors nécessaire de posséder une méthode de séparation donnant un degré de pureté suffisant pour les isoler puis les doser.

Pour les isoler, de nombreuses techniques chromatographiques ont été utilisées. Elles sont longues et complexes.

Pour doser les corticostéroïdes, différentes méthodes colorimétriques ont été proposées : elles dosent, soit les composés auparavant isolés, soit un groupe de substances ou hormones possédant les mêmes propriétés. Ainsi, la méthode de **PORTER** et **SILBER** dosera les corticostéroïdes ayant une chaîne latérale dihydroxyacétone.

Nous nous sommes proposé d'appliquer la chromatographie en phase gazeuse à la séparation et au dosage des 17 hydroxycorticostéroïdes urinaires afin de grouper dans une même technique à la fois la séparation et le dosage.

Dès 1906, **TSWETT** décrivit l'emploi de colonnes de verre remplies d'un adsorbant approprié pour la séparation de pigments colorés de plantes. Il employa alors le terme de « chromatographie ».

Mais ce fut en 1941, en s'appuyant sur les récentes découvertes sur les coefficients de partage entre solutions, que **MARTIN** et **SYNGE** réalisèrent les premières expériences de partage liquide / liquide puis de chromatographie sur papier.

Dans ces techniques, une phase liquide mobile est utilisée pour éluer des composés retenus sur une phase liquide stationnaire fixée sur un support. Ils suggérèrent alors de remplacer la phase mobile liquide par un gaz.

Cette suggestion resta toute théorique jusqu'en 1952 où **MARTIN** et **JAMMES** décrivirent le premier appareil de chromatographie en phase gazeuse.

Les possibilités réelles de la chromatographie en phase gazeuse ne furent évaluées qu'en 1954 lorsque **RAY** publia le premier chromatogramme. L'industrie pétrolière s'en empara, puis la biologie.

En 1960, **VANDEN HEUVEL (36)** publia les premières applications de la chromatographie en phase gazeuse pour la séparation de stéroïdes hormonaux.

Dans ce domaine, la chromatographie en phase gazeuse est d'un grand intérêt. En effet, par son aptitude à la séparation de composés aux propriétés très voisines dans des mélanges complexes, elle permet l'identification et le dosage de très nombreuses hormones corticosurrénaliennes **(35).**

Ces hormones stéroïdes dont la fragilité, les formules chimiques très proches, le point de fusion élevé, rendaient la chromatographie en phase gazeuse, difficilement utilisable, ont posé de nombreux problèmes.

A l'heure actuelle, ces problèmes sont résolus et font de la chromatographie en phase gazeuse une méthode de choix dans l'étude et le dosage des stéroïdes hormonaux.

En effet, la protection des molécules est très efficacement assurée par l'adjonction sur les fonctions hydroxyles de radicaux triméthyl silyl ethers. Cette protection permet de doser les hormones stéroïdes directement. La méthode est efficace mais pose un certain nombre de problèmes en raison du nombre élevé des métabolites urinaires. De plus, si elle est valable pour les 17 cétostéroïdes, les 17 hydroxycorticostéroïdes avec leur chaîne latérale sur le C_{17} s'opposent à un dosage quantitatif direct.

Au dosage direct, nous avons préféré pour doser les 11 oxy. 17 hydroxycorticostéroïdes, utiliser la méthode oxydative de **FEW (10) APPLEBY (2)**, qui coupe la chaîne latérale des hormones et les transforme en deux composés : 11 β hydroxyétiocholanolone et 11 β hydroxyandrostérone.

Ces deux dérivés sont alors facilement dosables par chromatographie en phase gazeuse après protection des molécules.

Outre sa rapidité, cette méthode nous a permis d'effectuer conjointement la séparation et le dosage des différents dérivés formés. Nous évitons ainsi le dosage colorimétrique.

Il nous a semblé indispensable de comparer la méthode colorimétrique de **ZIMMERMANN,** dosant les deux dérivés formés, à la chromatographie en phase gazeuse, afin de s'assurer de la concordance de leurs résultats.

Après divers essais de phases stationnaires dans les colonnes du chromatographe, nous avons choisi une phase plus polaire et plus stable que celles utilisées auparavant : l'OV 225. Cela nous a permis une meilleure séparation des dérivés formés **(26).**

Des épreuves dynamiques cliniques ainsi que l'étude des répercussions de l'effort sur l'excrétion des corticostéroïdes nous ont permis de constater que c'est une excellente méthode de routine.

———

CHAPITRE I.

———

RAPPEL BIOCHIMIQUE DU METABOLISME DES CORTICOSTEROIDES

———

Avant d'étudier le dosage des 17 hydroxycorticostéroïdes par chromatographie en phase gazeuse, il nous a semblé utile de situer ceux-ci dans le métabolisme général corticosurrénalien ainsi que d'évaluer les autres méthodes de dosage.

La biosynthèse des hormones corticosurrénaliennes a pour point de départ le cholestérol. A partir de celui-ci, différentes transformations conduisent par l'intermédiaire de la Pregnenolone à la Progestérone qui est le précurseur direct des corticoïdes en C_{21}.

Les hydroxylases introduisent dans le squelette de base des fonctions hydroxyles sur les carbones en 17, 21 et 11 β. En dehors des composés 11 β hydroxy tels la corticostérone et le cortisol, existent des composés 11 céto comme la déhydrocortisostérone et la cortisone.

Ces hormones sont déversées dans le sang et se trouvent alors en partie liée à une protéine particulière : la transcortine, qui les véhicule dans l'organisme, une faible part restant libre.

La régulation de la production des corticostéroïdes s'effectue par l'hormone adrénocorticotrope hypophysaire (A.C.T.H.). Un système de rétroaction ou « Feed-back » inhibe le mécanisme de sécrétion en fonction du taux sanguin hormonal.

Cette production hormonale est constamment dégradée dans le foie, successivement en dérivés di, tetra et hexahydrogénés par saturation du cycle A et obtention d'un 3∝ OL puis,en 17 cétostéroïdes.

Ces composés saturés sont conjugués à de l'acide glucuronique et excrétés dans les urines sous forme de glucuronides.

On a observé un rythme nycthéméral dans la production de l'hormone ce qui implique pour un dosage urinaire le recueil des mictions de 24 heures.

Lors du dosage des 17 hydroxycorticostéroïdes, il est nécessaire de doser les différents catabolites excrétés dans les urines à savoir : cortisol, cortisone, dihydrocortisol, tétrahydrocortisol, dihydrocortisone, tetrahydrocortisone,Allo T.H.F., cortol, cortolone et T.H.S.
Les dérivés tétrahydro représentent sous leur forme conjuguée les produits majeurs de l'élimination du cortisol. Il existe cependant dans l'urine de petites quantités de cortisol et cortisone à l'état libre ainsi que le cortol et la cortolone qui sont les alcools secondaires en C_{20} correspondant aux deux tétrahydrodérivés.

Il est possible de schématiser le métabolisme des 17 hydroxycorticostéroïdes de la manière suivante (schéma n^{o} 1).

METABOLISME DU CORTISOL.

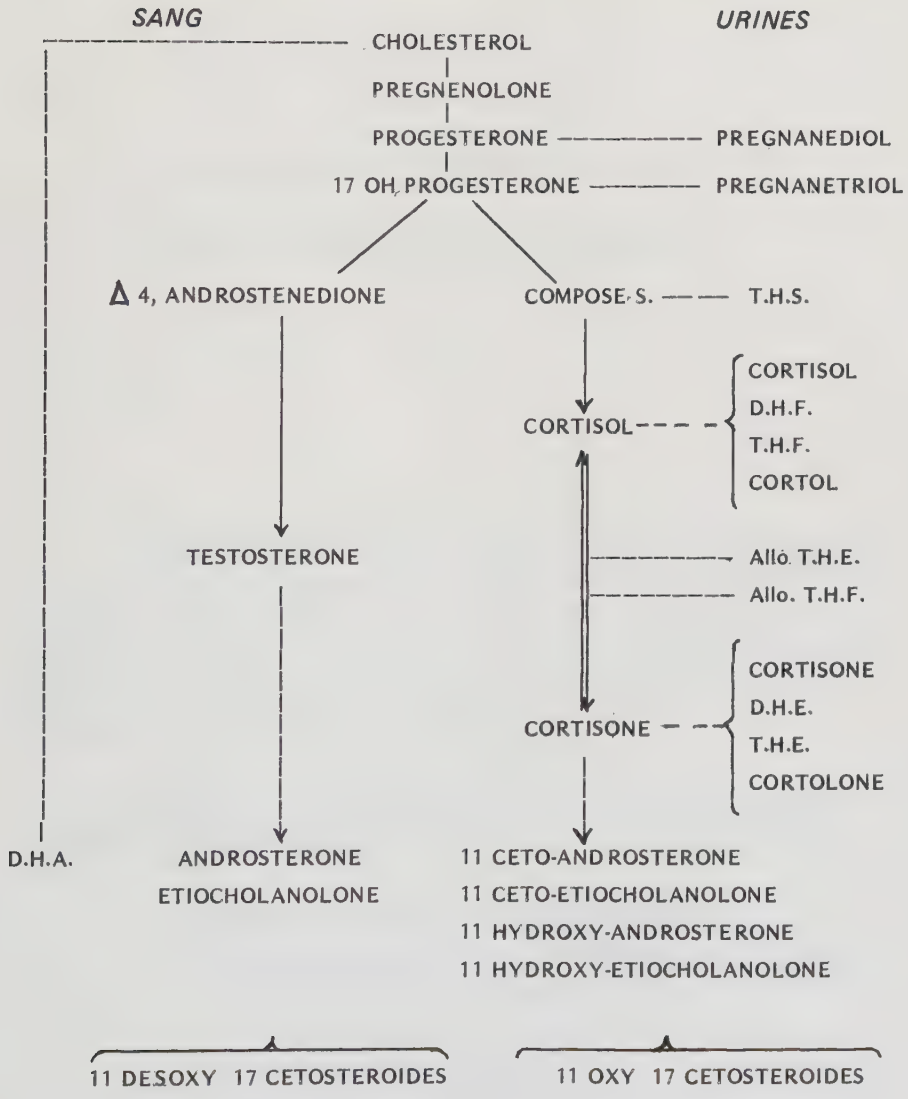


Schéma n° 1.

CHAPITRE II.

———

DIFFERENTES METHODES DE DOSAGE DES CORTICOSTEROIDES URINAIRES .

———

Le dosage des 17 hydroxycortisoctéroïdes présente des difficultés plus grandes que celui du groupe voisin des 17 cétostéroïdes. En effet, la chaîne latérale des corticostéroïdes, fixée en C_{17}, est très instable en milieu acide ou alcalin ; le degré et la nature de la conjugaison des composés excrétés dans les urines sont mal connus ; de nombreux composés sont de nature inconnue.

Différentes méthodes ont été proposées afin de doser ces composés, soit séparément, soit en groupe.

On distingue alors deux groupes de méthodes :

- Méthode colorimétrique de **PORTER** et **SILBER** avec formation de phénylhydrazone.

- Méthodes oxydatives avec :
  - dosage par colorimétrie.
  - dosage par chromatographie en phase gazeuse.

1 - Méthode colorimétrique de PORTER et SILBER avec formation de phénylhydrazone :

La méthode employée a été décrite en 1953 par **GLENN** et **NELSON (11)**, elle permet le dosage des corticostéroïdes possédant une chaîne latérale dihydroxyacétone sur le carbone C_{17}.

Après hydrolyse par la β glucuronidase, extraction au chloroforme, lavage et deshydratation, l'extrait urinaire est chromatographié sur une colonne de florisil. Les différentes fractions recueillies subissent alors la réaction colorée de **PORTER** et **SILBER (32)** dans laquelle on emploie la phenylhydrazine en milieu sulfurique. On dose alors cortisol, cortisone, tetrahydrocortisol, tétrahydrocortisone et tétrahydro 11 desoxycortisol.

Le manque de pureté relatif du produit final ainsi que la présence possible dans les extraits urinaires de « chromogènes » interférants font douter de la spécificité de cette méthode.

De plus, les hexahydrodérivés ; cortol et cortolone échappent au dosage ainsi que les 11 oxy 17 cétostéroïdes provenant du cortisol et ses métabolites non encore identifiés.

La méthode de **PORTER** et **SILBER**, dosant entre 20 et 30% des métabolites du cortisol, est à l'heure actuelle souvent remplacée par la méthode oxydative de **APPLEBY (2)**.

2 - Méthodes oxydatives :

Dans ces méthodes, les 17 hydroxycorticostéroïdes urinaires sont transformés en 17 cétostéroïdes par une oxydation. Les 17 cétostéroïdes normalement présents dans les urines sont préalablement réduits par le borohydrure de sodium de manière à ne pas interférer dans le dosage. Les 11 oxy 17 cétostéroïdes néoformés sont ensuite évalués soit selon la réaction colorimétrique de **ZIMMERMANN (40)**, soit par chromatographie en phase gazeuse.

a) Dosage par la méthode colorimêtrique de ZIMMERMANN.

Dès 1952, **NORYMBERSKI (30) (31)** avait proposé de convertir les 17 hydroxycorticostéroïdes en « néo 17 cétostéroïdes » en les oxydant avec du bismuthate de sodium.

L'action du bismuthate de sodium se situe au niveau de la chaîne latérale en C_{17} des hydroxycorticostéroïdes qu'il scinde en laissant une fonction cétone.

La chaîne — CO—CH_2 OH des cortisol cortisone, de leurs dérivés di, tétra et hexahydroxylés, l'allo T. H. F, et allo T. H. E; la chaîne —CHOH—CH_2 OH des cortol cortolone et leur 6 βOH dérivés; la chaîne -CHOH—CH_3, des pregnanétriol et leur 11 oxydérivés, sera coupée laissant une fonction cétone en 17.

Si une réduction préalable au borohydrure de sodium a été effectuée avant l'oxydation, il faut y ajouter la 17 hydroxyprogestérone et ses dérivés car il y a réduction des fonctions cétone en C_{17} mais aussi en C_{11} et en C_{20}.

On regroupe donc les « 17 hydroxycorticostéroïdes totaux ». C'est **APPLEBY (2)** qui, le premier, a décrit ce processus de dosage des 17 hydroxycorticostéroïdes totaux.

Il est possible en effet de doser une grande partie des métabolites urinaires 17 hydroxylés à savoir : 17α hydroxyprogestérone, prenanétriol, 11 désoxycortisol, cortisol, cortisone, T. H. E, T. H. F, tétrahydroxy 11 desoxycortisol, cortol, cortolone.

Les principales étapes de la méthode décrite par **APPLEBY** sont :

— Traitement par le borohydrure de sodium afin de réduire les fonctions cétone en fonction alcool secondaire. Puis oxydation par le bismuthate de sodium afin de former des 17 cétostéroïdes à partir des 17 hydroxycorticostéroïdes possédant une chaîne latérale en 17.

— Elimination du surplus de bismuthate par du métabisulfite de sodium.

— Extraction puis détermination par la méthode colorimétrique de **ZIMMERMANN.**

Cette méthode est simple, rapide et adaptée à la routine. Cependant, par rapport à la méthode de **PORTER** et **SILBER,** elle présente les avantages suivants :

- elle dose un groupe homogène : les composés formés étant les dérivés attendus des stéroïdes urinaires connus.
- les difficultés dues à l'hydrolyse des C_{21} sont résoluesà l'oxydant se chargeant de l'hydrolyse.

Cependant, dès 1961, **NORYMBERSKI** montre les limites de cette méthode : présence possible de 11, 17 dihydroxyprogestérone et de ses métabolites ; interférence éventuelle de sucres réducteurs ou de méprobamate dans les résultats.

FEW (10), puis **METCALF (24)** ont amélioré la technique de **APPLEBY.**

La principale modification fut la substitution du bismuthate de sodium par du métapériodate de sodium **(10).**

Comme le bismuthate, le métaperiodate de sodium est capable de dégrader l'acide glucuronique libérant le stéroïde sous forme de formiate ; cependant, à l'inverse du bismuthate, il n'altère pas la 11 β OH étiocholanolone formée lorsqu'il est employé à des concentrations convenables.

Les 17 cétostéroïdes formés par ce traitement sont alors séparés par chromatographie sur colonne en 11 desoxy et 11 oxyfractions.

FEW utilise une chromatographie de partage sur colonne de célite ; **COPINSCHI (7),** préfère une chromatographie d'adsorption sur colonne d'alumine. Les 11 oxy et 11 désoxyfractions sont alors déterminés séparément par la réaction colorimétrique, de **ZIMMERMANN.**

Dans cette méthode, la récupération après chromatographie sur colonne varie entre 80 % et 102 %.

b) Dosage par chromatographie en phase gazeuse :

HORNING (13) proposa de doser par chromatographie en phase gazeuse les 17 hydroxycorticostéroïdes séparément. Cette méthode devint difficilement applicable en raison du très grand nombre de métabolites du cortisol.

Dès 1966, **MURPHY (29)** proposa la chromatographie en phase gazeuse pour remplacer la chromatographie sur colonne et la réaction colorimêtrique de **ZIMMERMANN.** Il conservait toutefois la technique de **APPLEBY** qui permet un dosage global de 17 hydroxycorticostéroïdes transformés par oxydation en deux dérivés : 11 β OH androstérone et 11 β OH étiocholanolone.

La chromatographie en phase gazeuse se déroulant à des températures élevées, il est nécessaire de protéger les dérivés formés. Cette protection est étudiée ulférieurement.

Par rapport à la technique de **MURPHY** nous avons choisi une phase stationnaire : OV 225 **(26)** plus stable à la chaleur et présentant une polarité excellente pour assurer la séparation des deux dérivés 11 β hydroxyétiocholanolone et 11 β hydroxyandrostérone.

———

CHAPITRE III.

———

PARTICULARITES DU DOSAGE DES CORTICOSTEROIDES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.

———

Si la chromatographie en phase gazeuse s'est imposée ces dernières années comme une technique de choix dans la recherche et le dosage des stéroïdes, ce n'est qu'après qu'ait été résolu un certain nombre de difficultés dues en majorité à la structure même de la molécule stéroïdienne.

La principale difficulté a été la thermolabilité de la molécule. Si quelques stéroïdes ont une structure relativement solide leur permettant de subir une chromatographie directe, la grande majorité ne peut supporter une traitement aussi traumatisant qu'une vaporisation à température élevée.

Le choix des colonnes, leur nature, leur phase stationnaire, puis le type de détecteur à utiliser furent des facteurs déterminants dans la réussite d'une chromatographie en phase gazeuse de stéroïdes.

I — PROTECTION DE LA MOLECULE.

Il a été nécessaire de résoudre en premier lieu le problème posé par le risque de destruction de la molécule du stéroïde par la chaleur lors de sa vaporisation, puis durant son séjour sur la colonne.

De par sa structure: squelette cyclopentanoperhydrophénantrène, cycle A insaturé tension interne dans le cycle de phénanthrène, la vaporisation du stéroïde entraîne une décomposition de celui-ci en plusieurs dérivés (38).

Dans de telles conditions, il est difficile sinon impossible d'utiliser cette technique à des fins qualitatives ou quantitatives sans une stabilisation préalable de la molécule.

La présence d'une chaîne latérale sur le carbone 17 des 17 hydroxycorticostéroïdes rend le problème encore plus ardu.

Certains auteurs ont proposé une chromatographie en phase gazeuse directe des corticostéroïdes. La présence de la chaîne latérale en C_{17} rend l'aspect qualitatif du dosage très incertain et la quantification impossible.

Un essai de protection des 17 hydroxycorticostéroïdes a été tenté par transformation totale du composé de départ thermolabile en son produit d'oxydation thermostable. Différents agents oxydants ont été essayés : terbutyl chromate (25), bismuthate de sodium (30), périodate de sodium (20) (24), coupent la chaîne latérale des 17 hydroxycorticostéroïdes. Dans cette méthode, les 17 hydroxycorticostéroïdes sont alors transformés en 17 cétostéroïdes.

La chromatographie directe des dérivés formés après oxydation n'est pas très satisfaisante car elle donne lieu à de nombreuses interférences dans la détermination d'un mélange de stéroïdes et de leurs métabolites d'oxydation.

De plus, le problème de la tension interne des cycles A insaturés et phénanthrène n'est pas résolu.

Ces méthodes d'oxydation ont été conservées pour couper la chaîne latérale des 17 hydroxycorticostéroïdes.
Le problème de la protection thermique de la molécule ayant été solutionné par la fixation de différents radicaux.

A - FIXATION DE RADICAUX.

Il a été tenté la fixation de très nombreux radicaux protecteurs sur les corticostéroïdes. Nous étudierons successivement la fixation de radicaux Acétyl, N - diméthylhydrazine et surtout Triméthylsilyl.

— Acétylation des molécules.
— N - Diméthylhydrazine.
— Formation de Triméthylsilylethers.

1 - Acétylation des molécules :

La protection des différentes molécules de stéroïdes s'obtient par fixation sur les fonctions hydroxyle **(5)** du radical Acétyl sous l'action de l'anhydride acétique en solution dans la pyridine.

Cette technique précise et reproductible ne semble cependant s'appliquer de façon valable qu'à des mélanges simples. De plus, l'acétylation se fait mal sur les corticostéroïdes.

2 - Stabilisation par réaction avec la N, N Diméthyl hydrazine.

VANDEN HEUVEL (37) a étudié la formation de diméthyl hydrazone avec les stéroïdes possédant les fonctions cétone.

Ces dérivés se prêtent mal à un dosage classique des stéroïdes urinaires car la présence d'impuretés accélère leur décomposition par l'air ou la lumière.

3 - Formation de triméthylsilyléthers :

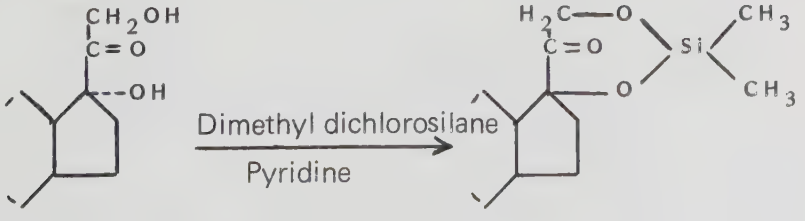
Cette technique stabilise des composés possédant une ou plusieurs fonctions hydroxylées et qui ont une thermolabilité importante **(22) (33)**.

Cette silylation doit être effectuée en milieu anhydre car la réaction est radicalaire et la présence d'eau décompose le réactif.

Ces radicaux procurent à la molécule une protection grâce à leur atome de silicium très stable à forte température.

a) Emploi du dimethyldichlorosilane :

KELLY (19) a réalisé une protection de la molécule par formation de dérivés silylés avec le diméthyl dichlorosilane dans la pyridine. On obtient une cyclisation de la molécule qui suffit pour la rendre stable.



Le composé formé possède des propriétés chromatographiques remarquables mais la réaction ne s'effectue qu'à 40% de rendement. De plus, cette technique est inutilisable pour des composés possédant une fonction hydroxyle en dehors de la chaîne latérale.

b) Emploi du H.M.D.S.

Cette méthode est plus générale que la précédente, il n'y a pas cyclisation mais simpment fixation d'un radical triméthyl silyl sur les fonctions hydroxyles de la molécule.

La silylation s'effectue à l'aide d'un mélange constitué par un libérateur de radicaux triméthyl silyl mis en présence d'un catalyseur de réaction dans un solvant commun aux hormones et au mélange silylant.

Ces dernières années de très nombreux libérateurs de radicaux triméthyl silyl ont été utilisés; le principal est l'H.M.D.S. ou hexaméthydisilazane, cependant il n'est pas rare de trouver le B.S.A. ou N,O Bis triméthyl silyl acétamide, T.M.S. I.ou triméthyl silyl imidazole.

Le catalyseur de réaction généralement utilisé est le triméthylchlorosilane (T.M.C.S.).

On aura donc :

$$\text{. (Steroïde} - \text{OH) + (CH}_3\text{)}_3\text{ Si - NH - Si (CH}_3\text{)}_3$$

$$\xrightarrow[\text{H.M.D.S.}]{\Sigma\ \text{T.M.C.S.}} \text{. Stéroïde} - \text{O} - \text{Si (CH}_3\text{)}_3 + 2\,\text{NH}_3$$

Il y a suppression des liaisons intermoléculaires par pont hydrogène. La volabilité augmente ce qui est un facteur supplémentaire de rapidité. En outre, les différences de poids moléculaire entre stéroïdes sont accrues entraînant une meilleure séparation.

Dans certains cas, en particulier, les corticostéroïdes, cette protection n'est pas suffisance pour effectuer un dosage précis. La fixation des radicaux triméthylsilyl doit être complétée par la formation de dérivés méthyloxime pour stabiliser la chaîne latérale.

Cette méthode permet de fixer un groupement méthyloxime sur les fonctions cétoniques en C_3, C_{17} et C_{20} des molécules **(39) (9).** La fonction cétone en C_{11} ne réagit pas **(28).**

La molécule du stéroïde se trouve alors parfaitement stabilisée : fonctions cétones par méthyloxime, fonctions hydroxyles par triméthylsilyl **(8),** mais les temps de rétention se trouvent alors considérablement augmentés.

B - VALEUR DE LA PROTECTION DE LA MOLECULE.

La généralisation de la triméthyl silylation permet de penser que c'est la méthode la plus intéressante.

Dans le cas des 17 hydroxycorticostéroïdes, une oxydation préalable de la chaîne latérale, suivie d'une triméthylsilylation des fonctions hydroxyles, permet un dosage global de nombreux dérivés urinaires.

II — AUTRES PROBLEMES POSES PAR LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DE STEROIDES.

Une fois le problème de la protection de la molécule résolu, le choix des colonnes à employer ainsi que celui du détecteur présente un certain nombre d'impératifs.

A - CHOIX DE LA COLONNE.

— Le support :

La chromatographie sera d'autant meilleure que les échanges entre la substance à analyser et la phase stationnaire seront facilités. La surface d'échange devra donc être la plus grande possible ; pour cela, une porosité importante liée à une finesse de grain sera donc indispensable. Pour les hormones stéroïdes, le plus employé est le chromosorb W. Il possède une inertie chimique importante, une bonne stabilité thermique ainsi qu'une adsorption nulle vis à vis de la substance utilisée **(14) (17).**

— Choix de la phase stationnaire :

Ce choix est extrèmement important : de lui dépend toute la séparation. D'une façon générale, les constituants polaires sont séparés grâce à des phases stationnaires également polaires. Le temps de rétention sera d'autant plus élevé que leur affinité pour la phase stationnaire sera grande.

La principale difficulté rencontrée se situe au niveau de la stabilité des phases stationnaires.

Après avoir essayé SE 30 à 1% sur gas chrom., puis XE 60 sur celite, il nous a semblé préférable d'utiliser, parmi les phases stationnaires OV, celles qui sont polaires. Elles donnent une très bonne séparation des stéroïdes, en particulier OV 225 à 1,5 % sur chromosorb. ou gas chrom Q.

B - CHOIX DU DETECTEUR.

Les détecteurs les plus employés dans le dosage des stéroïdes sont les détecteurs à ionisation de flamme **(12).**

Le stéroïde est brulé en sortie de colonne dans une flamme, mélange d'hydrogène et d'air. Il y a ionisation du stéroïde avec production d'électrons qui vont se décharger sur une anode placée à côté de la flamme. Le courant engendré est amplifié et transmis à un enregistreur.

Ce type de détecteur présente un grand nombre d'avantages : il est très sensible, sa réponse est linéaire, la quantité minima détectable est inférieure à 0,1 µgr. Insensible à la chaleur, il possède une grande stabilité dans la réponse : 0,5 % de précision **(15).**

CHAPITRE IV.

———

DOSAGE DES 17 HYDROXYCORTICOSTEROIDES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.

———

I — MATERIEL ET TECHNIQUE.

Nous nous proposons de doser les 17 hydroxycorticostéroïdes urinaires selon une technique dont les trois étapes principales sont :

- Traitement chimique des urines selon la méthode de **FEW** modifiée par **METCALF.**
- Protection des molécules d'hormones par une triméthyl silylation.
- Séparation et dosage des hormones par chromatographie en phase gazeuse.

1 - Traitement chimique : méthode de FEW.

— **Matériel.**

Borohydrure de sodium P.A. Merck.
Métaperiodate de sodium P.A. Merck.
NaOH N, 2N, 10N, Titrisol Merck.
Acide acétique R.P. Prolabo.
Ethanol R.P. Prolabo.
Ether R.P. Prolabo.
Sulfate de sodium « Pur sec » Prolabo.
pH-mêtre Querré Type 58 - Rue Cousin - Bordeaux
Bain marie à 60°
Agitateur à ampoules « Agitelec » Toulemonde: Paris.

— **Technique.**

Cette technique comprend trois étapes :

- Réduction des 17 cétostéroïdes présents.
- Oxydation des 17 hydroxycorticostéroïdes.
- Extraction.

a) Réduction :

A 50 ml d'urines ajustées à pH 7 avec de la soude normale, on ajoute 5 ml d'une solution de borohydrure de sodium à 10 % dans de la soude 0,1 N préparée extemporanément.

Après réduction pendant 30 minutes au bain-marie à 60°, on détruit l'excès de borohydrure de sodium par de l'acide acétique à 25 % pendant 5 minutes au bain-marie à 60°.

b) Oxydation :

Réajustement à pH 7,1 par NaOH N, puis oxydation par 20 ml de métapériodate de sodium à 10 % au bain-marie à 60° pendant 10 minutes. On ajoute 1,5 ml de lessive de soude afin d'hydrolyser les formiates.

c) Extraction :

Les hormones sont alors extraites des urines ainsi traitées par 180 ml d'éther. La phase éthérée est lavée deux fois par successivement 10 ml de soude 2 N et 10 ml d'eau distillée. Deshydratation complète par sulfate de sodium « pur sec » et filtration sur filtre siliconé Whatman. Evaporation de l'éther sous courant d'azote au bain-marie à 60°.
Le résidu sec est alors repris par 1 ml d'ethanol R.P.
0,2 ml correspondant à 10 ml d'urines sont alors prélevés afin d'être silylés puis chromatographiés en phase gazeuse.

2 - Protection des molécules : Triméthylsilylation :

—— **Matériel :**
Hexaméthyldisilazane H.M.D.S. Pierce chem.comp.
Triméthylchlorosilane T.M.C.S. Pierce chem. comp.
Bistriméthylsilylacétamide B.S.A. Pierce chem. comp.
Acétate d'éthyle pour spectro « Uvasol » Merck.
Flacons coniques bouchés rodé emeri.
Azote « U » Air Liquide.

—— **Technique :**
Les 0,2 ml d'extrait urinaire en solution éthanolique sont évaporés dans un flacon à fond conique sous courant d'azote.

L'extrait sec est repris par 0,1 ml d'un mélange silylant préparé extemporanément suivant cette formule :

Acétate d'éthyle	0,9 ml.
H.M.D.S.	0,3 ml.
B.S.A.	0,2 ml.
T.M.C.S.	0,1 ml.

La silylation s'effectue au bain-marie à 60° pendant 20 minutes dans les flacons bouchés.

3 - Chromatographie en phase gazeuse :

—— **Matériel :**

- Chromatographe Girdel 75 FD 2 à double colonne et double détecteur à ionisation de flamme, électromètre et programmation.
- Colonnes pyrex OV 225 sur gas chrom Q 100-120 mesh. à 1,5 %. Longueur 2 mètres.
- Seringue « Hamilton » 10 µl.
- Enregistreur « Siemens » 1 millivolt. Kompensograph III.
- Azote U et hydrogène U Air liquide.
- Pompe à air à membrane.
- Hormones pures en solution alcoolique à 100 µg/ml.
  Ikapharm - Ramat Gan Israël.
  Pierce chimical company - U.S.A.

—— **Technique :**

L'extrait urinaire est injecté dans le chromatographe, après avoir été silylé, à l'aide d'une seringue de 10 µl.

Les conditions d'expérience suivante sont réalisées sur le chromatographe.

- Θ injecteur 265°
- Θ colonne 232°
- Θ détecteur 265° C

Débit du gaz vecteur 30 ml/mn.
Vitesse de déroulement du papier sur l'enregistreur 1 cm/mn.
Sensibilité x 128.

Le chromatogramme représentant les différentes hormones séparées en plusieurs pics, s'inscrit alors sur le papier.

II - RESULTATS.

Une fois les conditions optimales de température et de pression des gaz fixées, il est indispensable de déterminer les temps de rétention des différents stéroïdes soit purs (Tableau n° 1), soit obtenus par traitement des principaux métabolites du cortisol (Tableau n°2).

1 - Chromatogrammes des hormones pures ou traitées :

Tableau n° 1.

Temps de rétention des dérivés triméthylsilyléthers des principaux 17 cétostéroïdes purs :

17 cétostéroïdes T.M.Si	Temps de rétention
11 β OH Etiocholanolone	8 mn 43 s
11 β OH androstérone	7 mn 46 s
11 céto-étiocholanolone	6 mn 43 s
11 céto.androstérone	5 mn 55 s
D.H.A.	3 mn 55 s
Etiocholanolone	3 mn 17 s
Androstérone	2 mn 48 s

Tableau n° 2.

Temps de rétention des dérivés obtenus en traitant les principaux métabolites du cortisol, la D.H.A. et les 11 oxy 17 cétostéroïdes par la méthode de FEW suivie d'une silylation.

Dérivés T.M.Si de	Temps de rétention.
D.H.A	1 mn 31 et 2 mn 52
11 β OH étiocholanolone	2 mn 58 s
11 β OH androstérone	2 mn 58 s
11 céto étiocholanolone	2 mn 58 s
11 céto androstérone	2 mn 58 s
Allo Tétra hydrocortisol	7 mn 46 s
Tétrahydrocortisol	8 mn 43 s
Tétrahydrocortisone	8 mn 43 s
Cortol, cortolone	8 mn 43 s.

2 - Chromatogramme d'extraits urinaires :

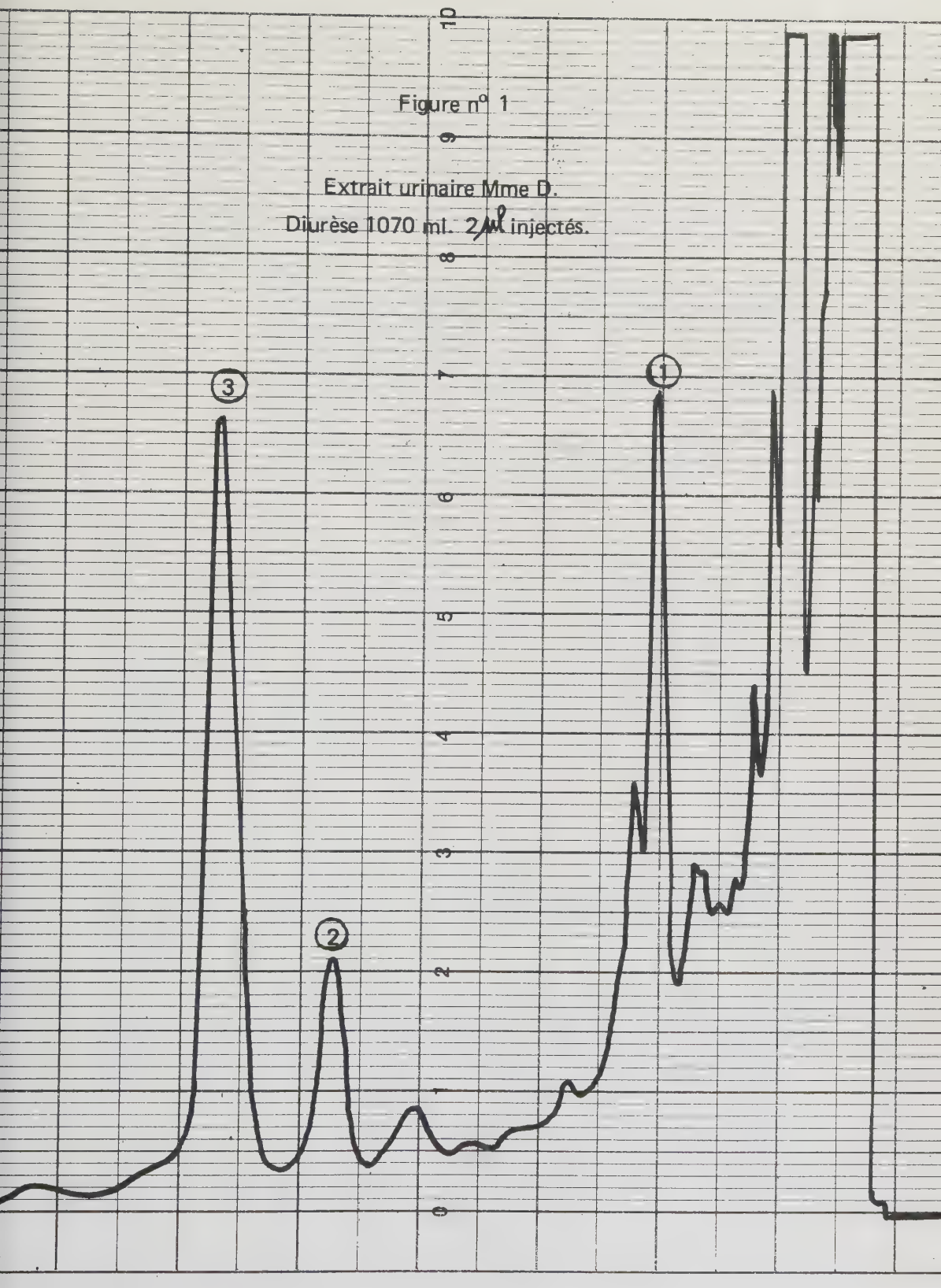
Après avoir vérifié les temps de rétention de chaque stéroïde ou de ses dérivés après traitement, la méthode de **FEW - APPLEBY** a été appliquées à des urines. Sur ces urines fraîchement recueillies, il aura été auparavant vérifié l'absence de sucres réducteurs. Si des traces ou une présence ont été décelées, il est alors nécessaire d'augmenter la quantité de métapériodate de sodium.

Deux microlitres, représentant 0,25 ml d'urines fraîches, injectés dans le chromatographe, nous donnent le chromatogramme suivant (Figure n° 1).

Figure n° 1

Extrait urinaire Mme D.

Diurèse 1070 ml. 2 µl injectés.



Sur ce chromatogramme, on peut constater l'existence de trois pics principaux :

- pic n°1 représentant les 17 cétostéroïdes transformés en 17 hydroxydérivés.
- pic n°2 représentant la fraction « Allo » des 17 hydroxycorticostéroïdes. tranformée en 11 β hydroxyandrostérone.
- pic n°3 représentant les 17 hydroxycorticostéroïdes transformés en 11 β hydroxyétiocholanolone.

Avant l'injection des urines , une gamme étalon d'hormones pures (11 β hydroxyandrostérone et 11 β hydroxyétiocholanolone) est injectée. Elle servira de référence pour le dosage des extraits urinaires. Pour obtenir le dosage des 17 hydroxycorticostéroïdes, il suffit d'additionner les valeurs fournies par les deux pics : 11 β hydroxyandrostérone et 11 β hydroxyétiocholanolone. Pour obtenir l'excrétion journalière, on doit tenir compte de la dilution ainsi que du rapport prise d'essai / diurèse.

Au résultat obtenu, un coefficient de 1,19 doit être appliqué, ceci afin de tenir compte de la différence des poids moléculaires entre les stéroïdes urinaires et leurs dérivés formés après rupture de la chaîne latérale.

La différence obtenue avec un étalon interne n'étant pas significative, nous avons pu supprimer celui-ci, une gamme étalon comprenant plusieurs hormones semble donner une précision satisfaisante.

3 - Etude de la reproductibilité de la méthode :

Deux mesures parallèles sont effectuées sur une même quantité d'urine prélevée sur le même échantillon: Nous avons obtenu les résultats suivants (Tableau n° 3).

Tableau n° 3.

Reproductibilité de la méthode.

Extrait urinaire	Dosage 1	Dosage 2
N° 100	6,8	6,5
N° 200	2,3	2,2
N° 300	7,9	8,1
N° 400	5,3	5,3
N° 500	11,3	11,6
N° 600	12,7	12,5
N° 700	15,5	15,8
N° 800	7,6	7,6
N° 900	10,9	11
N° 1000	7,6	7,5

Ecart-type $\pm$ 2,6 %.

———

CHAPITRE V.

———

COMPARAISON ENTRE LA METHODE COLORIMETRIQUE ET LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.

———

Ces deux méthodes ont en commun l'oxydation préalable des 17 hydroxycorticostéroïdes qui les transforme en 17 cétostéroïdes. Dans la chromatographie en phase gazeuse, il est nécessaire de doser les 11 β hydroxyétiocholanolone et les 11 β hydroxyandrostérone formés alors que dans la méthode de FEW, les 11 oxy 17 cétostéroïdes formés sont séparés par chromatographie de partage sur colonne des 11 désoxy 17 cétostéroïdes, le dosage se faisant par la méthode colorimétrique de ZIMMERMANN. COPINSCHI (7) modifie légèrement cette méthode en préférant une chromatographie d'adsorption sur colonne d'alumine.

Matériel :

Benzène pour « spectro » Riedel de Haen,
Alumine pour chromatographie Merck,
Ethanol P.A. Merck.
Potasse Prolabo,
Spectrophotomètre D.B. Beckman,
Enregistreur Beckman.

Matériel de chromatographie en phase gazeuse Girdel, Hormones pures (Ikapharm. Ramat gan Israël), en solution éthanolique à 100 µg/ml.

Méthodes :

— Méthode de Few suivie de la méthode de Zimmermann.
— Chromatographie en phase gazeuse.

Résultats :

Tableau comparatif.

X X X

1 - **Méthodes colorimétriques de dosage des 17 hydroxy-corticostéroïdes :**

a) Chromatographie sur colonne :

Après l'oxydo-réduction selon la méthode précédemment décrite et l'extraction à l'éther, l'extrait sec est repris par du benzène afin d'être passé sur colonne d'alumine.

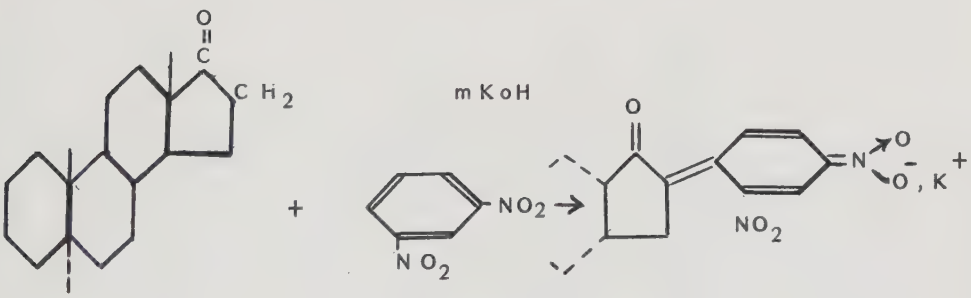
La colonne d'alumine sera éluée successivement par du benzène pur ⟶ Fraction I, puis par du benzène à 0,6 % éthanol ⟶ Fraction II, puis par du benzène à 3 % ⟶ Fraction III. Dans la fraction II, nous retrouvons les 11 désoxy alors que les 11 oxy sont dans la Fraction III.

Les 11 β hydroxyéthiocholanolone et 11 β hydroxyandrostérone, se trouvant dans la fraction III, on effectue sur celle-ci une réaction colorimétrique dite de **ZIMMERMANN.**

b) Réaction colorimêtrique de ZIMMERMANN.

La réaction colorimêtrique de ZIMMERMANN permet le dosage des substances ou groupe de substances possédant dans leur molécule un groupement dit « méthylène actif » adjacent à un carbonyle. Ce « méthylène actif » réagit avec le métadinitrobenzène en présence d'alcali. Il se développe alors une coloration violette lisible au spectrophotomètre à λ maximum 520 mμ. **(40).**

Les 11 β hydroxyétiòcholanolone et 11 β hydroxyandrostérone possèdent ce méthylène actif en C_{16}, adjacent à un carbonyle en C_{17}.



2 - Méthode par chromatographie en phase gazeuse :

A cette méthode colorimêtrique, nous avons opposé une chromatographie en phase gazeuse qui, tout en simplifiant les manipulations, donne une précision bien supérieure dans les résultats.

A partir des mêmes urines et après leur avoir fait subir le même traitement jusqu'à l'extraction, en comparant les deux méthodes, nous avons obtenu les résultats suivants (Tableau n° 4).

Comparaison entre la méthode colorimétrique de ZIMMERMANN et la chromatographie en phase gazeuse en mg/24 heures.

Extraits urinaires	C.P.G.	ZIMMERMANN.
1	8,3	8,2
2	6,8	5,1
3	7,2	6,6
4	10,5	10,6
5	3,8	4,2
6	10	10,3
7	7,6	7,7
8	5,4	5,8
9	4,1	4,2
10	12,3	12,8
11	7,5	9,3
12	8,9	10,5
13	6,1	6,1
14	24,7	24,2
15	7,1	7,4

Tableau n° 4.

CHAPITRE VI.

———

DISCUSSION DE LA METHODE

———

Les chromatogrammes obtenus permettent de constater que, comme l'a montré **FEW**, les principaux métabolites urinaires du Cortisol : T.H.E., T.H.F., Allo T.H.F., Cortol, Cortolone, sont transformés quantitativement en 11 β hydroxyétiocholanolone et 11 β hydroxyandrostérone.

La réduction préalable par le borohydrure de sodium est vérifiée. En effet, les 11 oxy 17 cétostéroïdes présents dans les urines sont complètement transformés en 17 hydroxystéroïdes. Le temps de rétention de leurs dérivés silylés est de 2 mn 58 sec. Le temps de rétention de ces 17 hydroxystéroïdes néoformés diffère notablement du temps des 11 β hydroxyétiocholanolone et 11 β hydroxyandrostérone issus de l'oxydation par le métaperiodate de sodium.

Pour ces deux derniers nous avons obtenu des temps de rétention de 7 mn 46 et 8 mn 43 sec., temps nettement plus long que celui des 17 hydroxystéroïdes néoformés. Une telle différence conditionne la spécificité de la méthode.

L'emploi d'une colonne chargée avec de l'OV 225 nous a permis une bien meilleure séparation qu'avec XE 60 - SE 30, aussi bien entre les 17 hydroxystéroïdes et les 17 cétostéroïdes néoformés, qu'entre les deux 17 cétostéroïdes néoformés et dosés.

Les pics de 11 β hydroxyandrostérone et 11 β hydroxyétiocholanolone obtenus à partir d'extraits urinaires sont bien individualisés et comparables à ceux des produits purs.

La précision de la méthode de **FEW** est excellente **(10) (23)** : écart-type ramené à la moyenne de ± 3,2 %. L'emploi de la phase gazeuse améliore encore la précision de la méthode.

La reproductibilité de cette méthode est particulièrement bonne si les conditions opératoires et les proportions de réactifs sont scrupuleusement conservées. L'étude de 10 urines différentes mais choisies sur une gamme étendue de diurèse et de concentration hormonale nous a permis de constater un écart type de ± 2,6 % (Tableau n° 3).

Par rapport à la méthode colorimétrique de **PORTER** et **SILBER,** qui dose les corticostéroïdes possédant la chaîne latérale 17α hydroxy 20, 21 cétol,soit 20 à 30 % de la sécrétion du cortisol, la méthode de **FEW** suivie d'une chromatographie en phase gazeuse est beaucoup plus représentative de l'activité de la corticosurrénale ; le groupe des métabolites dosés correspond en moyenne à 45 % du cortisol secrété.

L'étude comparative des chromatographie en phase gazeuse et méthode colorimétrique de **ZIMMERMANN** appliquées à la technique de **FEW - APPLEBY,** nous a permis de constater que, si un gain de temps appréciable était obtenu lors de la chromatographie en phase gazeuse, les deux méthodes donnent des résultats rigoureusement comparables(Tableau n° 4).

Si, sur un graphique nous posons en abcisse les résultats donnés par la chromatographie en phase gazeuse (C P G) et en ordonnée les résultats donnés par le dosage des mêmes urines en colorimêtrie (Z), nous obtenons une bonne corrélation entre les deux méthodes (Figure n° 2).

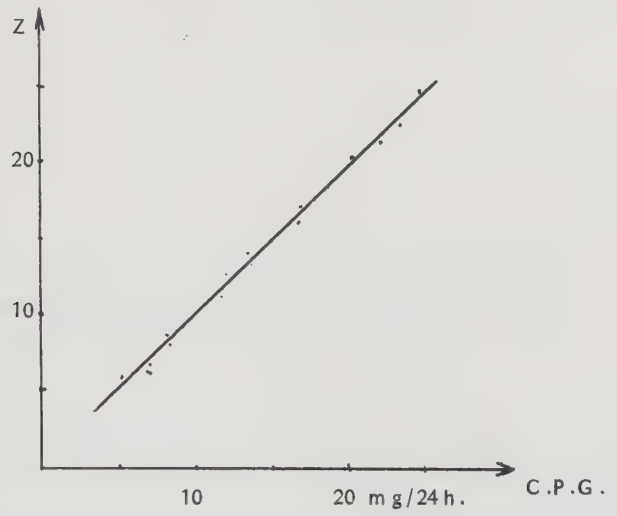


Figure n° 2.

En comparant ces résultats, il a pu être établi le « coefficient de corrélation » entre ces deux méthodes (r = 0,99).

Cette technique est rapide, avec un équipement convenable, 2 heures $\frac{1}{2}$ permettent de réaliser un dosage.

HORNING (18) pense que par sa simplicité, sa rapidité et sa très grande précision, cette technique de dosage des 11 oxy 17 hydroxycorticostéroïdes, devrait connaître une large utilisation.

Des épreuves dynamiques réalisées sur l'homme en milieu hospitalier, l'étude des variations de l'excrétion des 17 hydroxycorticostéroïdes urinaires au cours d'un effort physique prolongé, nous ont permis de constater les possibilités d'application de cette méthode à la routine.

———

CHAPITRE VII.

OBSERVATION D'EPREUVES CLINIQUES DYNAMIQUES.

Les épreuves dynamiques sont destinées à exercer sur la glande surrénale une stimulation ou un freinage afin de situer à quel niveau se situe l'origine de troubles pathologiques.

1 - Epreuves de stimulation à l'A.C.T.H. : test de THORN (3).

Après injection de 25 mg d'A.C.T.H. en perfusion lente on a pu constater sur le chromatogramme :

— Chez le sujet normal : une forte augmentation du pic des 11 β hydroxyétiocholanolone néoformés.

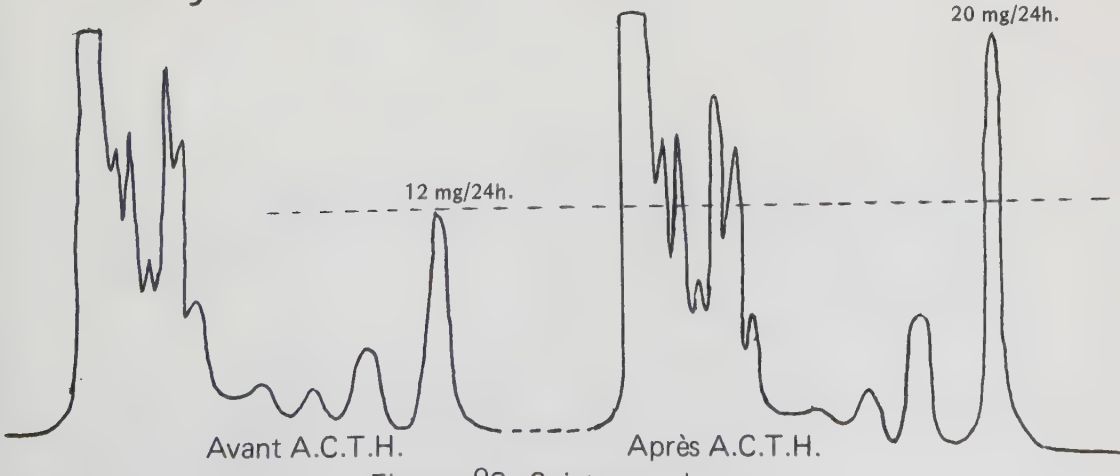
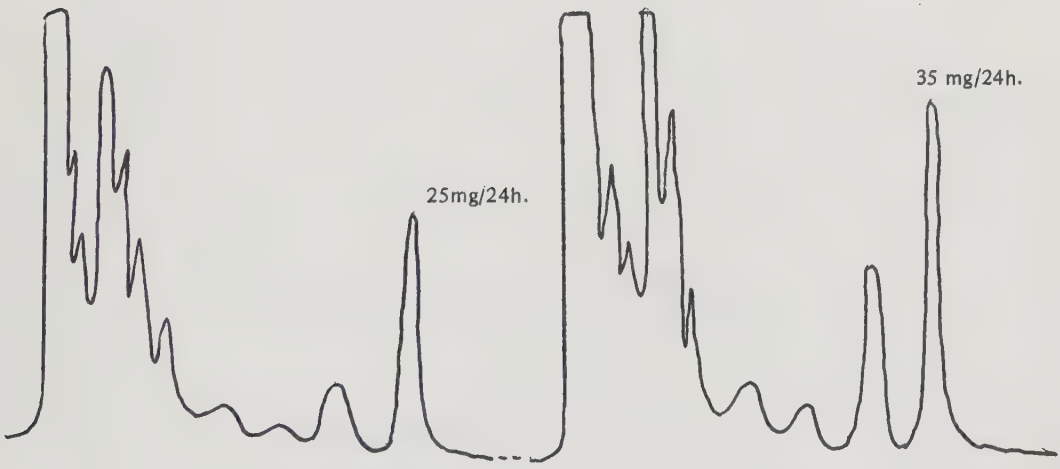


Figure n°3 : Sujet normal.

— Chez les sujets atteints de divers troubles surrénaliens tels que :

. maladie de Cushing, on note une ascension exagérée
. maladie de Simons ou cachexie hypophysaire, on note une forte élévation des 11 βOH étiocholanolone et androstérone néoformés, reflets des 17 hydroxycorticostéroïdes urinaires.



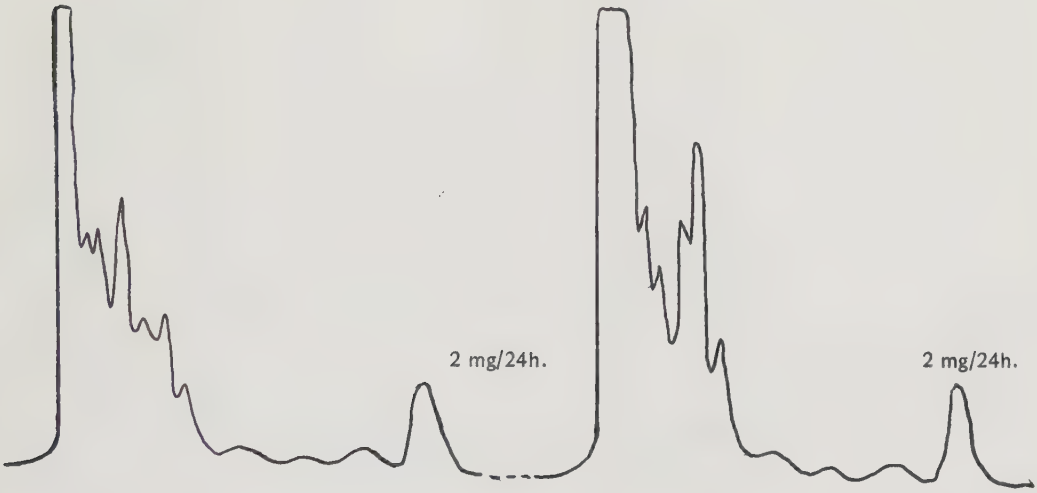
Avant A.C.T.H. Après A.C.T.H.

Figure n° 4 : Maladie de Cushing.

. maladie d'Addison.

Après injection d'A.C.T.H., le chromatogramme ne présente pas d'augmentation des pics de 11 β hydroxyétiocholanolone et andros-

térone, qui restent très bas ($<$3 mg / 24 heures).



Avant A.C.T.H. Après A.C.T.H.

Figure n° 5 : Maladie d'Addison.

. Tumeur maligne.

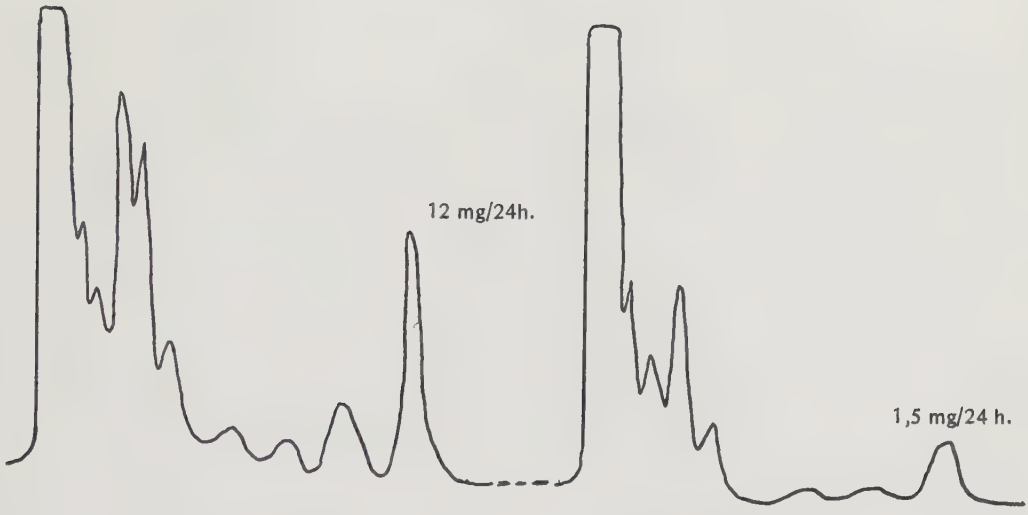
On note une hypersécrétion non stimulée par A.C.T.H.

2 - Epreuves de freination à la dexaméthasone (21).

Son but consiste, au moyen d'un corticoïde actif à faible dose, à bloquer la sécrétion de l'A.C.T.H. hypophysaire sans gêner les dosages urinaires par un apport exogène trop important d'hormones stéroïdes.

L'administration quotidienne de 3 mg de dexaméthasone pendant cinq jours nous a permis de constater :

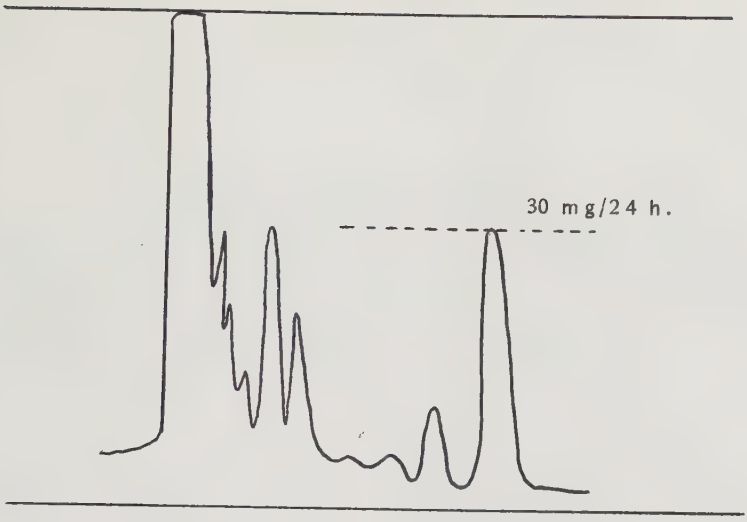
— Chez le sujet normal : une forte diminution des 11 β hydroxyétiocholanolone et 11 B hydroxyandrostérone néoformés (de 0,5 à 1,5 mg / 24 heures).



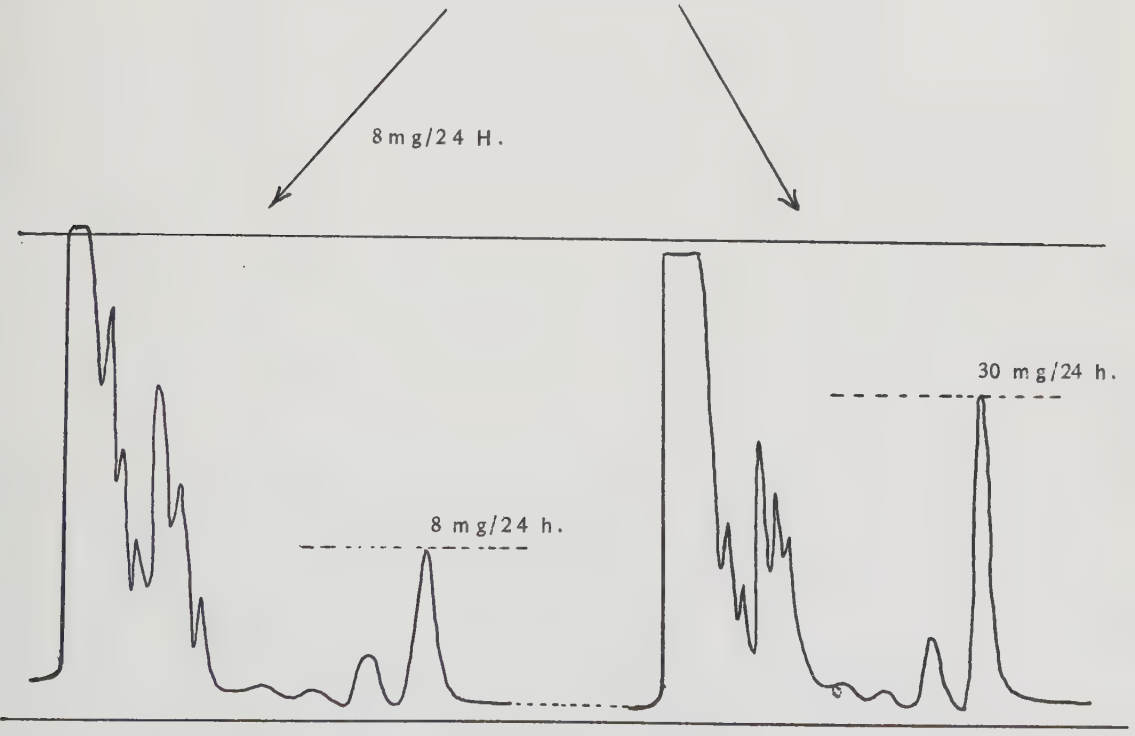
Avant déxaméthasone Après dexaméthasone

Figure n° 6 : Sujet normal.

— Chez le sujet atteint de divers troubles surrénaliens.
  . dans la maladie de Cushing, à la dose de 8 mg/jour pendant trois jours, on observe une baisse du taux des 11 β hydroxyétiocholanolone et 11 β hydroxy-androstérone néoformés.
  . dans le cas de tumeurs, le test de freination ne fait aucun effet.



Hypersécrétion : Avant Dexamethasone.



Cushing

Tumeur.

Après Dexamethasone.

Figure n° 7.

Ces différents tests dynamiques nous ont permis de vérifier que, tout en étant une méthode de routine très intéressante, la chromatographie en phase gazeuse permet de visualiser sur un graphique d'enregistrement, les effets d'une épreuve et ainsi d'être d'un grand intérêt pour le clinicien en favorisant son diagnostic.

———

CHAPITRE VIII.

ETUDE DES VARIATIONS DE L'EXCRETION DES 17 HYDROXYCORTICOSTEROIDES URINAIRES AU COURS D'UN EFFORT PHYSIQUE PROLONGE.

Un travail **(27)** sur les répercussions de l'effort physique sur l'excrétion des 17 hydroxycorticostéroïdes urinaires nous a permis de constater l'intérêt de la chromatographie en phase gazeuse lors des dosages hormonaux.

Depuis les observations de **SELYE (34),** de nombreux travaux ont mis en évidence la participation des hormones corticosurrénaliennes à la réponse de l'organisme à des agressions diverses. Ces réactions de l'organisme sont déclenchées par les centres hypothalamiques sous l'influence de stimuli exogènes divers.

Parmi ces stimuli, nous avons étudié l'état de fatigue créé par un effort physique. Une consommation importante de glucose ainsi qu'un état physiologique nouveau, ont des répercussions importantes sur la sécrétion des corticostéroïdes.

Dans la régulation glucose - glycogène, les hormones cortico-surrénaliennes, cortisol et cortisone, prennent une part non négligeable.

Cette étude a été faite sur une équipe de cyclistes professionnels français qui ont été suivis pendant 48 heures.

Un premier groupe de dosage des 17 hydroxycorticostéroïdes a été fait sur les urines des cyclistes en préparation hivernale. (Tableau n° 5). Ensuite, les dosages ont été effectués en période d'activité physique intense, soit violente et très traumatisante pour l'organisme (étape de montagne du tour de France) (Tableau n° 6), soit longue et régulière (étape de plaine) (Tableau n° 7). Nous avons obtenu les résultats suivants :

Tableau n° 5 :

En période de préparation (en µg / h.).

Coureur	Avant effort	Après effort	En récupération.
1	250 µg/h	350 µg/h	210 µg/h
2	252	430	216
3	228	164	210
4	325	392	186
5	175	244	298
6	218	331	115
7	172	458	142
8	310	320	180
Moyenne horaire.	255 ← 75 →	330 ← 135 →	195

Tableau n° 6.

Etape de montagne (en µg / h).

Coureur	Post effort	Récupération
1	142 µg/h	102 µg/h
2	468	195
3	95,5	83,4
4	58	58
5	90,5	81,5
6	432	57,8
7	248	143
Moyenne horaire	219	178

Tableau n° 7.

Etape de plaine (en µg/h).

Coureur	Post effort	Récupération
1	97 µg/h	67 µg/h
2	195	178
3	102,5	95,5
4	122,5	91
5	182	268
6	578	173
7	508	470
Moyenne horaire	255 µg/h	157

RESULTATS.

On a pu remarquer que la diurèse horaire suivant l'effort ne différait pas significativement de la diurèse de repos. Ceci tient, indépendamment d'un apport de boissons, à une poussée hypertensive ainsi qu'à l'augmentation de la perméabilité de l'épithélium glomérulaire **(6)** neutralisant les effets de la sudation et de la polypnée.

Dans les limites de 800 à 4000 ml, des variations de diurèse n'ont aucune répercussion sur la sécrétion du cortisol ou celle de ses principaux métabolites **(1).**

COMMENTAIRES.

L'exercice musculaire prolongé aboutit à des modifications du taux des 17 hydroxycorticostéroïdes urinaires excrétés, à savoir une élévation immédiate suivie d'une baisse tardive.

Si l'élimination des 17 hydroxycorticostéroïdes semble témoigner d'une hyperactivité corticosurrénalienne consécutive à l'effort : 30 % supérieure au taux moyen d'excrétion avant effort, l'abaissement plus tardif de leur taux pourrait correspondre à une diminution relative, de l'activité de la glande : 21,4 % inférieure au taux moyen d'excrétion avant effort.

Cette diminution de l'activité de la glande pourrait être accompagnée d'une réduction du catabolisme cortisolique **(4).**

En ce qui concerne les étapes du Tour de France, dans lequel la répétition des efforts est quotidienne, on peut se demander si la recharge secondaire de la glande n'est pas incomplète et ne risque pas, au bout de quelques jours, d'aboutir à un épuisement relatif de celle-ci.

Les taux sont en effet extrêmement bas, en particulier lors de l'étape de montagne. On peut remarquer chez certains un épuisement probable de celle-ci, le taux après effort immédiat n'étant pas supérieur à celui de la nuit.

———

CONCLUSION

———

Notre but était d'obtenir une méthode de dosage des 11 oxy 17 hydroxycorticostéroïdes urinaires qui soit à la fois simple, exacte, rapide et capable d'évaluer avec précision une sécrétion hormonale dont les ordres de grandeur sont très variables.

APPLEBY et **FEW** nous ont proposé une méthode chimique de transformation des hormones corticosurrénaliennes hydroxylées en C_{17} en deux dérivés simples facilement dosables.
Une oxydation par le métapériodate transforme les 17 hydroxycorticostéroïdes urinaires en 17 cétostéroïdes. L'élimination préalable des 17 cétostéroïdes normalement présents dans les urines ayant été faite par une réduction au borohydrure de sodium. Les 11 oxy 17 hydroxycorticostéroïdes urinaires se retrouvent alors sous la forme de deux dérivés : 11 β hydroxyandrostérone et 11 β hydroxyétiocholanolone.

Ces dérivés, une fois séparés par chromatographie d'adsorption sur colonne, doivent être dosés par la méthode colorimétrique de **ZIMMERMANN.** Nous avons utilisé la chromatographie en phase gazeuse afin de grouper en une seule méthode, la séparation et le dosage.

Les chromatogrammes ainsi obtenus, ont permis de constater la transformation qualitative et quantitative des principaux métabolites urinaires du cortisol en ces deux dérivés.

Nous avons constaté la séparation complète aussi bien entre les 17 hydroxycorticostéroïdes et 17 cétostéroïdes néoformés qu'entre les deux cétostéroïdes néoformés et dosés.

Cette méthode de dosage est précise ; par rapport à la méthode de **FEW** suivie d'un dosage colorimêtrique, l'écart type ramené à la moyenne passe de $\pm$ 3,2 % à $\pm$ 2,6 %. De plus, le groupe des métabolites dosés correspond en moyenne à 45 % du cortisol secrété alors que la méthode de **PORTER** et **SILBER** n'en dose que 20 à 30 %. On obtient donc un dosage beaucoup plus représentatif de l'activité de la glande corticosurrénale.

La comparaison entre un dosage colorimêtrique et un dosage par chromatographie en phase gazeuse montre qu'une très étroite concordance peut être obtenue dans les résultats (coefficient de corrélation r = 0,99).

La possibilité d'application de cette méthode à la routine nous a été démontrée par l'étude d'épreuves dynamiques réalisées en milieu hospitalier ainsi que par l'étude de variations de l'excrétion des 17 hydroxycorticostéroïdes urinaires au cours d'un effort physique prolongé.

BIBLIOGRAPHIE

1 - AARSKOG (D) et STOA (K.F)
— Acta. endocr. 1964, **45**, 286-296.

2 - APPLEBY (J.I), GIBSON (G), NORYMBERSKI (J.K) et STUBBS (R.D.) — Biochem. J. 1955, **60**, 453.

3 - BIRKE (G) et Coll.
— J. clin. endocr. métab. 1958, **18**, 736.

4 - BUGARD et Coll. — Rev. patho. gene. et physio. 1961, **61**, 730, 61.

5 - CARR (H.F) — Bioch. biophys acta 1963, **71**, 178-184.

6 - CASTENFORS (J)
— Acta physiol. scand. 1967, **70**, 194, 206.

7 - COPINSCHI (G) et Coll.
— Compt. rend. 1964,**258**, 62.

8 - ENGEL (L) — Steroids 1970, **16**, 4, 377-386.

9 - FALES (H.M) et LUUKKAINEN (T).
— Anal. chem. 1965, **37**, 955.

10 - FEW (J.D.) — J. endocr. 1961, **22**, 31.

11 - GLENN (E.M) et NELSON (D.H).
— J. clin. endocr. métab. 1953, **13**, 911.

12 - HEWLETT. PACKARD.
— Doc. « detectors » 1, 9.

13 - HORNING (E.C) et VANDEN HEUVEL (F.A).
— Ann. Rev. bioch. 1963, **32**, 709.

14 - HORNING (E.C.) et Coll.
— Anal. Chem. 1963, **35**, 526.

15 - HORNING (E.C.) et BROOKS (C.J.W).
— Separ. sci. 1966, **1**, 555.

16 - HORNING (E.C.) et Coll.
— J. gas. chrom. 1967, **5**, 283.

17 - HORNING (E.C.) et Coll.
— J. chromato. 1968, **38**, 439 - 459.

18 - HORNING (E.C.) et EIK - NESS (K.B.)
— C.P.G. of steroids.
Springer verlag Berlin - Heidleberg New-York 1968.

19 - KELLY (R.W.)
— Steroids. 1969, **13**, 13, 507-518.

20 - KITTINGER (G.N.) et Coll.
— Steroids 1968, **11**, 1, 47-71.

21 - LIDDLE (G.W.) et WILLIAMS (W.C.)
— « Human adrenal cortex ».
Currie ed. Edimburg - Livingstone p. 461.

22 - LUUKKAINEN (T) et Coll.
Bioch. biophys acta 1961, **52**, 599.

23 - MATHIEU - NAST (C), MATHIEU (H.P) et BLANQUET (P).
— Clin. chem. acta 1968, **21**, 91 - 99.

24 - METCALF (M.G).
— Clin. chem. 1966, **12,** 258.

25 - MENINI (E).
— Bioch. J. 1962, **84,** 195 - 201.

26 - MIGOT (F) - MATHIEU (H.P) et Coll.
— Bull. soc. pharm. Bordeaux 1972, **111,** 138-142.

27 - MIGOT (F) et Coll.
— Bull. soc. pharm. Bordeaux 1974.
(Sous presse).

28 - MURAKAMI (M.D).
— Ann. pédiat. jap. 1969, **15,** 3, 27-36.

29 - MURPHY (D) et WEST (H.F).
— J. endocr. 1966, **36,** 331 - 340.

30 - NORYMBERSKI (J.K) et STUBBS (R.D.).
— Lancet 1953, **i,** 1276.

31 - NORYMBERSKI (J.K) et BROOKS (C.J.W).
— Bioch. J. 1952, **55,** 371.

32 - PORTER (C.C) et SILBER (R.H.).
— J. Biol. chem. 1950, **185,** 201.

33 - ROSENFELD .
— Steroids 1964, **4,** 1, 147.

34 - SELYE (H.J).
— Clin. endo. 1946, **6,** 117 - 230.

35 - SCHOLLER (R) et JAYLE (M.F)
— C.P.G. des stéroïdes hormonaux.
Dunod ed. Paris 1968.

36 - VANDEN HEUVEL (W.J.A) et HORNING (E.C).
— J. Am. chem. soc. 1960, **82**, 34-81.

37 - VANDEN HEUVEL (W.J.A)
— Bioch. Biophys. acta 1963, **74**, 560.

38 - VANDEN HEUVEL (F.A.) .
— Bioch. biophys, res. com. 1960, **3**, 4,
356 - 360.

39 - WILEY et CHANG .
— J. med. chem. 1963, **6**, 611.

40 - ZIMMERMANN (W)
— Hoppe seyler's. z. physiol. chem. 1935,
233, 257 - 264.

41 - Exploration endocrinienne usuelle II.
— Surrénale. Doc. Roussel.

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Physique Pharmaceutique de la Faculté de Pharmacie de Bordeaux.

(Monsieur le Professeur Cl. VRIGNAUD).

Ont collaboré à ce travail, les Laboratoires de Physiologie appliquée à l'Education Physique et aux Sports.

(Madame le Professeur G. ROUGIER).

et le Service des Radio-isotopes de l'Hôpital Saint-André à Bordeaux.

(Monsieur le Professeur P. BLANQUET).